

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-50133

(43) 公開日 平成8年(1996)2月20日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/576	B			
33/569	L			

審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平6-184474	(71) 出願人	000003159 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(22) 出願日	平成6年(1994)8月5日	(72) 発明者	押原 渉 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株式会社滋賀事業場内
		(72) 発明者	青山 直美 滋賀県大津市園山1丁目1番1号 東レ株式会社滋賀事業場内

(54) 【発明の名称】 免疫化学的測定方法

(57) 【要約】

【構成】 試料中に存在する微生物の内部抗原に対する抗体を不活化した後、微生物の表面構造物を破壊することにより微生物内部抗原を放出させ、微生物の内部抗原量を定量することを特徴とする免疫化学的測定方法。

【効果】 微生物中の抗原量がそれに対する抗体が大量に含まれる試料中においても簡便に測定できるようになり、特にB型肝炎D a n e 粒子の構成成分であるH B c A g を免疫化学的手法で測定することにより、B型肝炎ウイルス量の血中内変化を簡便な手法により直接的定量的に把握することが可能となった。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】試料中に存在する微生物の内部抗原に対する抗体を不活化した後、微生物の表面構造物を破壊することにより微生物内部抗原を放出させ、微生物の内部抗原量を定量することを特徴とする免疫化学的測定方法。

【請求項 2】微生物の内部抗原に対する抗体を不活化する手段として、酵素処理、熱処理、酸・アルカリ処理、変性剤処理、有機溶剤処理のいずれかあるいはそれを組み合わせ不活化することを特徴とする請求項 1 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 3】微生物が細菌、ウイルス、酵母、または菌であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 4】試料中に存在する B 型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体を不活化してから、B 型肝炎ウイルス表面抗原外皮を破壊することにより B 型肝炎ウイルスコア抗原を放出させ、B 型肝炎ウイルスコア抗原量を定量することを特徴とする請求項 1～3 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 5】B 型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体を不活化するに際し、あらかじめ B 型肝炎ウイルス表面抗原に対する免疫グロブリンによって処理した対象試料を用いることを特徴とする請求項 4 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 6】B 型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体を不活化する手段として、蛋白質分解酵素処理、熱処理、アルカリ処理のいずれかあるいはそれを組み合わせ不活化することを特徴とする請求項 4 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 7】B 型肝炎ウイルス表面抗原外皮を破壊して B 型肝炎ウイルスコア抗原を放出させる薬剤として、界面活性剤を用いることを特徴とする請求項 4 記載の免疫化学的測定方法。

【請求項 8】B 型肝炎ウイルスコア抗原量を測定するに際し、酵素を標識試薬として用いることを特徴とする請求項 4 記載の免疫化学的測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物内部に存在する抗原の定量的測定方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】通常、細菌、ウイルス、酵母、菌などの微生物はヒト体内では生体内防御機構いわゆる免疫によって駆逐され成育できない。その免疫力を発揮する主な因子の一つが抗体であり、一度感染罹病した病原微生物や、通常環境中に常在する微生物に対しては、ヒトは血中にその抗体を有するか、迅速に血中抗体量を上昇させることができる。

【0003】しかしながら、昨今諸事情により免疫力の低下した患者が増えており、いわゆる日和見感染が大き

な問題となりつつある。このような病態時には、常在する日和見感染病原体に対する抗体を含む健常者血清から免疫グロブリンを取得し、抗菌剤の補助療法として、免疫力の低下した患者に投与されだした。すなわち、人為的に、自然には生じないような量比の抗原と抗体が一時的に血中に共存する時期が生み出されている。

【0004】また、宿主の免疫力の低下を待って盛んに増殖するウイルスの存在様式は潜伏感染と呼ばれ体内で抗体反応の及ばない神経系などに巣くっている。この場合にも、一般に血中抗体量は増えている。ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルスがこの感染様式をとる。さらに体内で増殖しながら免疫を掻い潜る微生物も存在する。持続感染と呼ばれるこの様式は、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、歯周病起因細菌などにみられ、宿主が抗体量を上昇させているその環境下で、それぞれ異なるメカニズムにより成育を続けて宿主を蝕んでいく。

【0005】いずれにしても、抗体が存在すれば異種抗原である微生物は駆逐されるといった従来のような単純な機構では説明できない微生物感染が問題視されており、そのような状況下での微生物の定量法が望まれている。

【0006】B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染性粒子は、直径 42 nm の二重構造粒子、Dane 粒子である。その外皮のリポ蛋白質の示す抗原性が HBs 抗原 (HBsAg) であり、内部の直径 27 nm のヌクレオカプシドを形成する粒子 (コア粒子) の示す抗原性が HBc 抗原 (HBcAg) である。肝細胞に HBV が感染すると、細胞質内で外皮が外され、コア粒子中の部分二本鎖ウイルス DNA の情報が読まれて、ウイルス関連の蛋白質が合成されたり、ウイルス DNA の複製が行なわれ、細胞質内でコア粒子が増幅される。増幅したコア粒子は、細胞質内で外皮を被って Dane 粒子となり、コア粒子を持たない多数の管状粒子、球型粒子 (HBsAg) とともに血液中に放出される。

【0007】B 型肝炎の診断は、通常、血液中に B 型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) を検出することによって行なわれる。しかしながら、HBsAg の抗原の存在または血液中の濃度に関する情報は、B 型肝炎において感染時期や感染性粒子の量を正確に示すものではなく、慢性の同疾患においてむしろ肝障害の進行によって血中 HBsAg 濃度が下がるなど、ウイルス増殖の判定に用いることができない。

【0008】また、ウイルス増殖の判定に用いることができる代表的 HBV マーカーが HBe 抗原 (HBeAg) であって、未症候性のキャリアや慢性肝炎の経過を観察する上でも、治療をモニタリングする上でも最も有効な指標となってきた。HBeAg は HBV に感染した肝細胞から持続的に血中に放出され、HBeAg 陽性血液中には、Dane 粒子が多くウイルスに関連した DN

Aポリメラーゼの活性も高いことが知られており、ウイルス活動性の間接的定性的指標になってきた。しかしながら、HBeAg陽性からHBeAg陰性・HBe抗体(HBeAb)陽性へのセロコンバージョンが、常にHBeAgの質的变化(変異)に基づく現象である事が明らかになり、多くの場合ウイルス活動性の減少を反映するものの、ウイルスの量的変化を完全に反映できない例がある事が示唆され問題となっている。またB型肝炎治療法の進歩に伴い、ウイルス活動性の直接的定量的判定法が望まれるようになってきた。

【0009】感染性を有するウイルス量の血中内変化を直接的定量的に把握するために、Dane粒子の構成成分であるHBV-DNAやDNAポリメラーゼを検査することは既に日常的である。しかしながら、これらの方法は、時間や手間、費用のかかる方法であり、さらに放射性同位元素を使用する場合もあって、限られた施設でしか普及していなかった。

【0010】ウイルス量の血中内変化を直接的定量的に把握するもう一つの手段は、やはりDane粒子の構成成分であるB型肝炎ウイルスコア抗原(HBcAg)を測定することであり、免疫化学的手法を適用することにより、時間や手間、費用を減ずる事ができると考えられるが、現実的に普及していないのは、以下のような理由があった。

【0011】前述のように、HBcAgは血液中においてはHBsAgの外皮を被って存在するために、そのままではHBcAgとして測定することはできない。Dane粒子を界面活性剤などで処理し、外皮を取り除くことができることは判明していたが、一般にB型肝炎患者の血液中にはHBcAgに対する抗体(HBcAb)が高力価に存在し、血液中でHBcAgを放出させると大過剰のHBcAbと抗原抗体反応物を形成して、以後免疫化学的手法を適用できなくなる。

【0012】そこでDane粒子と血液中のHBcAbとを分離するために、Dane粒子にHBsAbとの免疫凝集物を形成させ、その後遠心分離洗浄を繰り返す方法(J. Immunology, 第117巻、102-105頁、1976)、超遠心を利用する方法(Gastroenterology, 第80巻、1420-1427頁、1981)、HBsAgに対する免疫グロブリンを結合させた不溶性担体で一旦Dane粒子を分離する方法(特公平5-76582)などが開示されてきたが、いずれも時間や手間あるいは特別な器具が必要であり、また試料中のHBcAbの除去も不十分であった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、微生物内部中に存在する抗原をそれに対する抗体が大量に存在する試料中から定量する簡便な方法を提供するものであり、たとえば、大量にHBcAbを含む試料中に存在するHBcAgを定量的に検出し得る簡便な方法を提供

することにある。

【0014】

【課題を解決するための手段】これを達成するために本発明による方法は、試料中に存在する微生物の内部抗原に対する抗体を不活化した後、微生物の表面構造物を破壊することにより微生物内部抗原を放出させ、微生物の内部抗原量を定量することを特徴とする免疫化学的測定方法に関するものである。

【0015】本発明における微生物とは細菌、ウイルス、酵母が好ましく用いられ、例えば日和見感染により敗血症を起こさせる主原因となる黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、E.faecalis、緑膿菌や大腸菌群、歯周病起因細菌であるP.gingivalisやA.actinomycetemcomitans、持続感染ウイルスであるB型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスが挙げられる。

【0016】本発明は宿主によって以前に免疫反応を受けたことにより、その抗体価が上昇しているものの試料中の抗体とは直接的には反応しない微生物の内部に存在する抗原を定量するために、試料中に存在するその抗体を不活化した後、微生物表面構造物を破壊し内部抗原を放出させ、定量するものであるが、この不活化手段としては酵素処理、熱処理、酸・アルカリ処理、変性剤処理、有機溶剤処理のいずれかあるいはそれらを組み合わせ行なうことができる。

【0017】中でも、本発明の好ましい1例としてB型肝炎ウイルスの内部に存在する抗原であるB型肝炎ウイルスコア抗原量を定量する場合を例にあげて本願発明を説明する。

【0018】すなわち、試料中に存在するB型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体(HBcAb)を不活化してから、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)外皮を破壊することによりB型肝炎ウイルスコア抗原(HBcAg)を放出させ、得られた溶液をHBcAgに対する免疫グロブリンとインキュベーションし、HBcAgに結合した免疫グロブリン量を測定して、試料中のHBcAg量を定量するものである。

【0019】試料中に存在するB型肝炎ウイルスコア抗原に対する抗体(HBcAb)の不活化に際しては、既に知られている天然型のHBcAgの安定性(J. gen. Virol., 第65巻、405-414頁、1984)あるいは組換え型のHBcAgの安定性(J. Clin. Microbiol., 第30巻、1617-1619頁、1992)を考慮して、温度、pH、界面活性剤、還元剤、有機溶剤、カオトロピックイオン、蛋白分解酵素などの条件を変化させることにより、HBcAgを破壊せずにHBcAbを破壊する条件を選択して、HBcAbの不活化が実施できる事を見出した。例えば、J. gen. Virol., 第65巻、405-414頁、1984を参考にするならば、37℃下10時間処理や56℃下4時間などの熱処理、pH11.5による処理、還元剤である0.5M2-メルカプトエタノール処理、カオト

ロビックイオンである3Mチオシアン酸アンモニウムや6M尿素処理などによって、天然型のHBcAgの抗原性は保たれる事が示されている。J. Clin. Microbio 1., 第30巻, 1617-1619頁, 1992 を参考にするならば、70℃下1時間処理や80℃下30分などの熱処理、pH10.5やpH5.0による処理、界面活性剤である4%SDSによる24時間処理、還元剤である40mM2-メルカプトエタノールによる48時間処理、有機溶剤である50%メタノールや50%エタノール処理、蛋白分解酵素であるトリプシンやキモトリプシン処理などによって、組換え型のHBcAgの抗原性は保たれる事が示されている。これらの知見より、一般の蛋白質にとっては過酷ともいえる条件下でHBcAgが安定であることを利用し、HBcAgを破壊せずにHBcAbを破壊する最適の下記条件を見出した。

【0020】すなわち、本発明において試料中に存在するHBcAbを不活化する手段としては、蛋白質分解酵素処理、熱処理、アルカリ処理のいずれかあるいはそれを組み合わせることが好ましく行なわれる。例えば蛋白質分解酵素処理としてはプロナーゼ、プロテアーゼK、トリプシン、キモトリプシンなどであり、熱処理温度としては好ましくは37-80℃であり、アルカリ処理としてはpH9以上が好ましく行なわれる。これらの不活化手段は各々単独で行なってもよいし、2種以上組み合わせても構わない。さらに好ましくは3種の組み合わせである熱処理、蛋白質分解処理およびアルカリ処理を使用するのが好ましい。

【0021】本発明で測定する試料は、一般的な生体試料や人為的に調製された溶液などなんでも良いが、好ましくは、人血液あるいはそれに由来する血清や血漿が用いられる。さらに好適には、B型肝炎ウイルスのDane粒子を一旦血液由来の他の成分と分離する操作により、HBcAgに対する人由来抗体の濃度を一部減少させた試料が用いられる。Dane粒子を他の成分と分離して一部減少させる操作については、前述のように、Dane粒子にHBsAbとの免疫凝集物を形成させ、その後に遠心分離する方法(J. Immunology, 第117巻, 102-105頁, 1976)、超遠心を利用する方法(Gastroenterology, 第80巻, 1420-1427頁, 1981)、HBsAgに対する免疫グロブリンを結合させた不溶性担体で一旦Dane粒子を分離する方法(特公平5-76582)などが利用できるが、特殊な装置や器具を使用せずにDane粒子の濃縮効果が期待できることから、Dane粒子にHBsAbとの免疫凝集物を形成させ、その後に遠心分離する方法が好適に利用できる。

【0022】HBcAb破壊後にHBsAg外皮を破壊するのに適する薬剤は、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルN-サルコシン酸ナトリウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム、塩化ドデシルピリミジニウム、バルミトイルリソレシチン、ドデシル-N-ベタイ

ン、ポリオキシエチレン-アルコール、ポリオキシエチレン-イソアルコール、ポリオキシエチレン-p-ト-オクチルフェノール、ポリオキシエチレン-ノニルフェノール、脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル、ドデシルスルホン酸ナトリウム、臭化テトラデシルアンモニウムおよびサポニンのような界面活性剤である。これらのうち特に好適な界面活性剤は、非イオン系の界面活性剤であり、特にポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ(Brij)、トリトン(Triton)、ノニデット(Nonidet)P40およびツイーン(Tween)などがあげられる。

【0023】中でもノニデット(Nonidet)P40が好ましく用いられる。

【0024】上述のように、本発明は試料中に存在する微生物の内部抗原を放出させ、微生物の内部抗原量を定量するものであるが、その定量方法は内部抗原に対する免疫グロブリンとインキュベーションさせ、結合した内部抗原量を免疫化学分析の分野で知られている、例えば凝集法やサンドイッチ法などの任意の方法である。

【0025】内部抗原としてB型肝炎ウイルスコア抗原を測定する場合を例にあげ詳細を説明すると、凝集法を用いる場合、HBcAgに対する免疫グロブリンは一般に、赤血球やラテックスなどの粒子に結合して使用される。HBcAgが存在すれば、これらの粒子の凝集をもたらし、HBcAg量を測定することができる。

【0026】サンドイッチ法を用いる場合、試料中のHBcAgは、放射性同位元素あるいは酵素などにより標識化された抗HBcAg免疫グロブリンと、不溶性担体に結合した同一かあるいは別の抗HBcAg免疫グロブリンとに、同時にあるいは段階的にインキュベートし、いわゆるサンドイッチ構造物を形成させる。その後に通常、不溶性担体と結合した標識体の量を測定することによりHBcAg量が測定できる。

【0027】

【実施例】

参考例 1. 血清中のHBcAbの減少

A. 検体と試薬 血清中のHBV-DNA量は、小西ら(医学と薬学, 第28巻, 813-823頁, 1992)に開示された化学発光法によるHBV-DNA定量法で測定した。4880pg/mlのHBV-DNAを含む慢性B型肝炎患者の血清をHBV-DNAを含まない正常ヒト血清で10倍ずつ2段階に希釈した。それぞれの希釈血清には、311pg/ml、49pg/mlのHBV-DNAが含まれていた。以下、未希釈の高力価血清をH、希釈の順番にM、L血清と記す。HBcAb量は、凝集法である三光純薬社製セロクリット-抗HBcあるいは競合法EIAである日本ロシュ社製コバスコアAnti-HBc EIAを用いて測定した。

【0028】B. 血清中のHBcAbの減少

①プロナーゼ処理・熱処理 50μlのH、M、L血

清にPBSに溶解した12.5 $\mu$ lの5mg/mlプロナーゼ（科研製薬社製、商品名アクチナーゼE）を加えて、37℃で一晩、70あるいは80℃で30分間処理した。プロナーゼの活性を停止するために12.5 $\mu$ lの500mMEDTAを添加後、コバスコアAnti-HBc EIAでHBcAbを測定した。結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

熱処理によるHBcAbの減少

血清	EIA値*			
	未処理	37℃-24	70℃30分	80℃30分
H	0.010	0.005	0.016	0.052
M	0.010	0.012	0.020	0.260
L	0.012	0.044	0.052	0.475
陰性血清	0.862	0.721	0.826	0.615

\* A492：競合法なので力価が高いほど値が小さい。

カットオフ値=0.345~0.246

\*20

熱アルカリ処理によるHBcAbの減少

血清	凝集価*		
	未処理	70℃30分	80℃30分
H	4 <sup>11</sup>	4 <sup>9</sup>	4 <sup>5</sup>
M	4 <sup>10</sup>	4 <sup>7</sup>	4 <sup>3</sup>
L	4 <sup>8</sup>	4 <sup>5</sup>	4 <sup>3</sup> 以下
陰性血清	4 <sup>3</sup> 以下	—	—

\*カットオフ値=4<sup>3</sup>

【0033】温度上昇に伴い、血清中のHBcAb力価が減少した。また、プロナーゼ添加の場合に見られたのと同様に、血清をアルカリ条件下にすることによっても凝固現象を避ける事ができた。

【0034】③Dane粒子の濃縮 Dane粒子は、外皮にHBsAgを有し、これに対する免疫グロブリンと反応して凝集物を形成する（Lancet、第1巻、695-698頁、1970）。また、この凝集物を低速遠心分離で濃縮洗浄を繰り返して、血清中の他の成分を除く試みもあった（J. Immunology、第117巻、102-105頁、1976）が、超遠心を繰り返しても血清中に存在していたHBsAbを完全に除く事は大変な手間である事も明らか

\*【0030】80℃の処理により、HBcAb力価に応じて、血清中のHBcAb力価が減少した。また通常、血清に60℃以上の熱処理を施すと、凝固反応が進行してその後の処理が困難になるが、プロナーゼを添加することにより、この現象が回避できた。プロナーゼ添加により、HBcAbの分解が促進するとともに、血清中の各種蛋白質が小分子量化して凝固しにくくなったと考えられる。

【0031】②熱アルカリ処理50 $\mu$ lのH、M、L血清に、12.5 $\mu$ lの0.1規定水酸化ナトリウムを加えて、70あるいは80℃で30分間処理した。溶液のpHを中性に戻すために12.5 $\mu$ lの0.1規定塩酸を添加後、セロクリット-抗HBcでHBcAbを測定した。結果を表2に示す。

【0032】

【表2】

であった（Gastroenterology、第80巻、1420-1427頁、1981）。

【0035】1mlのH、M、L血清に1 $\mu$ gの抗HBsAgモノクローナル抗体（日本バイオテスト社製HB-021）を添加して、37℃で30分間インキュベートした後に、12000rpm、30分間の遠心分離操作を行なった。沈殿を1mlのPBSに懸濁して、そのHBcAb価をセロクリット-抗HBcとコバスコアAnti-HBcで測定した。結果を表3に示した。

【0036】

【表3】

表3. Dane粒子の濃縮操作によるHBcAb価の減少

血清	濃縮前		濃縮後	
	凝集価	EIA価	凝集価	EIA価
H	4 <sup>11</sup>	0.010	4 <sup>9</sup>	0.022
M	4 <sup>10</sup>	0.010	4 <sup>7</sup>	0.081
L	4 <sup>8</sup>	0.012	4 <sup>5</sup>	0.349
陰性血清	4 <sup>3</sup> 以下	0.862	4 <sup>3</sup> 以下	0.776

【0037】過去の研究例が示すように、Dane粒子の濃縮操作だけでは、完全にHBcAbを除去できなかった。

【0038】④Dane粒子濃縮後の熱処理あるいは熱アルカリ処理 上記③のように調製したDane粒子沈殿\*

\*物を、上記①あるいは②のようにプロナーゼ熱処理あるいは熱アルカリ処理してHBcAb価を測定した。結果を表4と表5に示す。

【0039】

【表4】

濃縮処理溶液のプロナーゼ熱処理によるHBcAb価の減少

血清	プロナーゼ熱処理			
	70℃		80℃	
	凝集価	EIA価	凝集価	EIA価
H	4 <sup>8</sup>	0.036	4 <sup>5</sup>	0.641
M	4 <sup>6</sup>	0.273	4 <sup>4</sup>	0.784
L	4 <sup>4</sup>	0.743	<4 <sup>3</sup> *	0.887

\*4<sup>3</sup>以下

【0040】

※ ※【表5】

濃縮処理溶液の熱アルカリ処理によるHBcAb価の減少

血清	熱アルカリ処理							
	56℃		65℃		70℃		80℃	
	凝集価	EIA価	凝集価	EIA価	凝集価	EIA価	凝集価	EIA価
H	4 <sup>4</sup>	0.390	<4 <sup>3</sup>	0.859	<4 <sup>3</sup>	0.787	<4 <sup>3</sup>	0.886
M	<4 <sup>3</sup>	0.776	<4 <sup>3</sup>	0.857	<4 <sup>3</sup>	0.810	<4 <sup>3</sup>	0.856
L	<4 <sup>3</sup>	0.829	<4 <sup>3</sup>	0.882	<4 <sup>3</sup>	0.770	<4 <sup>3</sup>	0.847

【0041】①、②、③それぞれ単独の処理では十分にHBcAb価は減少しなかったが、表5に示すように、Dane粒子濃縮後に56～65℃の熱アルカリ処理を組み合わせることにより、血清由来のHBcAb価をほぼ消滅させることが可能になった。

【0042】参考例 2. 血清中のDane粒子の濃縮 ヒト正常血清で適当に希釈した500μlあるいは1mlのHBV-DNA陽性血清に1μgの抗HBsAg抗体（日本バイオテスト社製HB-021）を添加して、

37℃で30分間インキュベートした後に、12000rpm、30分間の遠心分離操作を行なった。沈殿を50μlのPBSに懸濁して、その全量を化学発光法によるHBV-DNA定量法で測定した。結果を表6に示す。表6に示すように、1～1000倍に希釈したDane粒子含有血清から、定量的にDane粒子が濃縮されていることが、HBV-DNAを定量することにより判明した。

【0043】

【表6】

血清	血清希釈	希釈血清の使用量 ( $\mu$ l)	回収HBV-DNA量 (pg)	回収率* (%)
A	$\times 1$	50	38.7	—
	$\times 1$	500	372.4	96
	$\times 1/50$	1000	15.8	102
	$\times 1/1000$	1000	0.74	96
B	$\times 1$	50	36.8	—
	$\times 1$	1000	712.0	97
	$\times 1/20$	1000	41.4	113
	$\times 1/1000$	1000	0.85	115

$$* \text{回収率} = \frac{\text{回収DNA量 (pg)} \times \text{血清希釈}}{\text{38.7 or 36.8 (pg)} \times \frac{\text{希釈血清の使用量 (}\mu\text{l)}{50 (\mu\text{l)}}} \times 100$$

## 【0044】実施例1

A. 検体と試薬 特開昭60-143772号公報に  
開示された方法を用いてDane粒子を調製して用い  
た。対照として、正常ヒト血清に精製したDane粒子  
を添加して用いた。検体中のHBsAg、HBeAg力  
価は、それぞれダイナボット社製オースザイムIIあるい  
はダイナボット社製HBe・EIA「アボット」で測定  
した。HBcAbは、セロクリット-抗HBcを用いて  
測定した。またナカネらの方法(J. Histochem. Cytoch  
em., 第22巻, 1084-1091頁, 1974)にしたがって、H  
BcAgに対する免疫グロブリンと西洋ワサビペルオキ  
シダーゼとの結合体を調製して使用した。pH9.0の  
重炭酸塩緩衝液中に溶解したHBcAgに対するモノク  
ローナル抗体(WBAG社製C4A7)をポリスチレン  
製マイクロタイタープレートで、4℃一夜、さらに0.  
5%の牛血清アルブミンを含むPBSで4℃一夜インキ  
ュベートすることにより、固相を調製し、使用直前に  
0.02%のTween-20を含むPBSで洗浄して  
使用した。

## 【0045】B. 手順

①ウイルス濃縮 1mlの血清に1 $\mu$ gの抗HBsA  
g抗体(日本バイオテスト社製HB-021)を添加し  
て、37℃で30分間インキュベートした後に、12000  
rpm、30分間の遠心分離操作を行なった。

【0046】②HBcAb破壊 上記沈殿をPBSに  
溶解した25 $\mu$ lの5mg/mlプロナーゼに懸濁し  
て、56℃で15分間インキュベートした。25 $\mu$ lの  
0.08規定水酸化ナトリウムを加えて、さらに56℃  
で15分間インキュベートした後、100mMリン酸ナト  
リウム、pH7.0に溶解した25 $\mu$ lの0.04規定  
塩酸と25 $\mu$ lの500mMEDTA、pH8.0を添  
加した。

## 【0047】③ウイルス破壊および固相による捕捉

上記抗体破壊液に対して、PBSに溶解した25 $\mu$ lの5  
%ノニデットP40、0.5%2-メルカプトエタノール  
を添加して、前記抗体固相化マイクロプレートに移し  
て、37℃で2時間インキュベートした。

【0048】④サンドイッチ検出 上記のマイクロ  
プレートを、0.02%のTween-20を含むPBS  
で2回洗浄してから、0.25%の牛血清アルブミンを  
含むPBSに溶解した100 $\mu$ lの1 $\mu$ g/ml西洋ワ  
サビペルオキシダーゼ標識抗体を添加して、37℃で2  
時間インキュベートした。0.02%のTween-2  
0を含むPBSで2回洗浄してから、150mM酢酸ナ  
トリウム、pH5.0に溶解した100 $\mu$ lの0.2m  
g/ml o-フェニレンジアミン、0.2mg/ml過  
酸化水素を添加し、37℃で30分間インキュベートした  
後、100 $\mu$ lの0.2規定硫酸を加えて反応を停止し  
た。このようにして得られた溶液の492nmの吸光度  
を光度計で測定した。

【0049】C. 結果 結果を表7に示した。表7上  
段に示したように、Dane粒子を含む血清中にHBc  
Abが存在しなければ、Dane粒子を濃縮後に、ウイ  
ルス破壊を行なうだけで、HBcAgが検出できた(表  
7上段第2列)。さらに抗体破壊の操作を加えることに  
より信号量が增大したのは、精製されたDane粒子に  
検出限界以下のHBcAbがまだ混入しているからかも  
しれない。そして表7下段に示したように、実際の臨床  
検体には多量のHBcAbが含まれており、ウイルス濃  
縮後にウイルス破壊を行なっただけでは、全くHBcA  
gは検出されなかった(表7下段第2列)。しかしなが  
ら、抗体破壊を行なってからサンドイッチ検出を行なう  
ことにより、臨床検体中のHBcAg量が測定できるよ  
うになったと結論する事ができる(表7下段第3列)。

【0050】

\* \* 【表7】

血清中のHBcAgの検出

Dane粒子添加血清* (HBcAb陰性) HBV-DNA含量	検体処理法		
	ウイルス濃縮	ウイルス濃縮 ウイルス破壊	ウイルス濃縮 抗体破壊 ウイルス破壊
0 pg/ml	0.005	0.005	0.006
2.2	0.008	0.007	0.014
21.9	0.003	0.067	0.150
253.8	0.001	0.971	over
HBsAg・HBeAg HBcAb 陽性血清			
A (DNA量1265pg/ml)	0.009	0.000	0.140
B (1126)	0.015	0.001	0.131
C (9662)	0.008	0.003	0.723

\* 精製したDane粒子を陰性血清中に添加して作成した。

【0051】

【発明の効果】本発明において、微生物内部中に存在する抗原をそれに対する抗体が大量に存在する試料中から

定量する簡便な方法、特に大量にHBcAbを含む試料中に存在するHBcAgを定量的に検出する簡便な方法を見出だした。